

RAFAELA FLÁVIA POMINI PINTO

**EFEITOS DO FGF10 NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

BOTUCATU- SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pinto, Rafaela Flávia Pomini.

Efeitos do FGF10 na maturação oocitária e produção de embriões bovinos in vitro / Rafaela Flávia Pomini Pinto. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ciro Moraes Barros

Capes: 21001006

1. Bovino - Reprodução. 2. Reprodução animal. 3. Apoptose. 4. Oogênese.

Palavras-chave: Apoptose; FGF10; Maturação; Oócito.

Aos que me deram asas e me ensinaram a voar. Meus Pais, Carlos e Marcia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais pela proteção e direcionamento que me permitiram evoluir ao longo das adversidades deste trabalho. Por sempre me guiarem pelo caminho da fé e da bondade.

Aos meus pais, que fazem dos meus sonhos os deles e nunca me deixam esquecer que eu tenho em quem me apoiar e pra onde voltar. Pelas orações, carinho e pela doação das duas vidas que não medem esforços pela minha felicidade. Vocês são responsáveis pelo que há de melhor em mim. Obrigada por tudo, obrigada por me amarem.

À Ana Carolina Pomini Pinto, pelas alegrias de uma vida, por ser minha irmã e minha amiga.

À Arlete Quadrini Pomini, a quem eu tenho como minha outra mãe, por me mostrar o poder real da fé e rezar por mim todos os dias.

À UNESP – Instituto de Biociências, pela oportunidade concedida para a realização deste mestrado.

Ao meu orientador, Professor Ciro Moraes Barros, por quem tenho profunda admiração, gratidão e respeito.

Ao Professor José Buratini Jr. e aos colegas do departamento de Fisiologia, pelo apoio e colaboração.

Aos amigos Anthony Castilho, Bárbara Loureiro e Maurício Favoreto, por estarem sempre dispostos a me ajudar. Pela paciência e dedicação que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Aos amigos, Eduardo Razza e Patrícia Fontes, por estarem presentes em minha vida dentro ou fora do laboratório. Pelas noites mal dormidas durante a realização do experimento, por toda ajuda prestada, pelas festas, risadas e pela amizade.

À Janahi Ticianelli, por trabalhar literalmente ao meu lado me ajudando de todas as formas possíveis. Por ser meu exemplo de competência, dedicação e equilíbrio. Por fazer parte da minha vida e me ensinar diariamente como ser uma pessoa melhor. Obrigada por tudo, minha amiga.

Às amigas Katharine Carvalho e Monique Campos, por participarem ativamente dos melhores anos da minha vida.

Aos amigos de pós-graduação: Cíntia, Antônio (Kaká), Lucacin, Estér, Fernanda, Isabele, José Renato, Leonardo, Mariana, Patrícia, Paula, Rafael, Raquel, Ronaldo, Rúbia e Vinícius. Que fizeram a rotina diária agradável e me proporcionaram momentos muito felizes durante esses anos.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Farmacologia, pela amizade e incentivo.

Muito Obrigada

*Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.*

Carl Jung

Índice

LISTA DE TABELA	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Maturação oocitária <i>in vivo</i>	4
2.2 Maturação <i>in vitro</i>	6
2.3 Apoptose	7
2.4 Competência e Desenvolvimento Embrionário Pré-Implantação	9
2.5 Fator de Crescimento Fibroblástico 10	11
3. REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2	20
EFEITOS DO FGF10 NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS <i>IN VITRO</i>	20
RESUMO	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAIS E MÉTODOS	26
EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA MATURAÇÃO E NA PORCENTAGEM DE APOPTOSE DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	27
1.1 Recuperação e classificação dos oócitos	27
1.2 Maturação oocitária <i>in vitro</i>	28
1.3 Ensaio de TUNEL e coloração Hoeschst - 33342	29
EXPERIMENTO 2: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	30
2.1 Preparo do sêmen e fertilização <i>in vitro</i>	30
2.2 Desnudamento e cultivo <i>in vitro</i> dos embriões bovinos	31
EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES <i>PLAC8</i> , <i>CDX2</i> E <i>COX2</i> EM EMBRIÕES BOVINOS	32
3.1 Extração de RNA total e reação de transcrição reversa	32

3.2 <i>Investigação da expressão gênica por PCR em Tempo real</i>	33
3.3 <i>Análise dos dados de PCR em tempo real</i>	34
RESULTADOS.....	35
EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA MATURAÇÃO E NA PORCENTAGEM DE APOPTOSE DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS <i>IN VITRO</i>	35
EXPERIMENTO 2: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	37
EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES <i>PLAC8</i> , <i>CDX2</i> e <i>COX2</i> EM EMBRIÕES BOVINOS.....	37
DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.....	34
Tabela 2. Taxas de clivagem, mórula e blastocisto.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	27
Figura 2. Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por qPCR em tempo real.....	35
Figura 3. Efeitos de diferentes concentrações de FGF10 (0; 2,5; 10; 50 ng/mL) na porcentagem de oócitos em metáfase I; metáfase II; metáfase II com extrusão do primeiro corpúsculo polar (Cp) corados com Hoechst- 33342 após 22h de maturação.....	36
Figura 4. Efeitos de diferentes concentrações (0; 2,5; 10; 50 ng/mL) de FGF10 na porcentagem de oócitos TUNEL positivos após 22h de maturação.....	36
Figura 5. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação <i>in vitro</i> sobre a expressão do mRNA do gene <i>COX2</i> nos pools de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	38
Figura 6. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação <i>in vitro</i> sobre a expressão do mRNA do gene <i>CDX2</i> nos pools de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	38
Figura 7. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação <i>in vitro</i> sobre a expressão do mRNA do gene <i>PLAC8</i> nos pools de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs - desintegrinas e metaloproteinases

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

AQP3 - aquaporina 3

AREG - ampiregulina

BMP15 - proteína morfogenética óssea 15

BSA - albumina sérica bovina

BTC - betacelulina

CAD - da sigla em inglês “caspase-activated DNAase”

CCOs - complexo cumulus oócito

CO₂ - gás carbônico

COX2 - ciclooxigenase 2

Cp - corpúsculo polar

CX43 - conexina 43

EGF-like - fatores de crescimento epidermal

EGFR - receptores de EGF

EREG - epiregulina

ERK - do inglês *extracellular-signal-regulated kinases*

ERK - quinases reguladas por sinais extracelulares

FGF - fatores de crescimento fibroblástico

FIV - fecundação *in vitro*

FSH - hormônio folículo estimulante

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HCl - ácido clorídrico

HSPA1A - proteína de estresse térmico A1

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

KGFII - fator de crescimento dos queratinócitos II

LH - hormônio luteinizante

LHR - receptor de hormônio luteinizante

MAPK - proteína ativadora da mitose

MI - metáfase 1

MII - metáfase 2

MIV - maturação *in vitro*

MPF - fator promotor da maturação

PDE3 - fosfodiesterase

PHE - penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PI3K - fosfatidil Inositol trifosfato

PIB - produto interno bruto

PIV - produção *in vitro* de embriões

PTX3 - pentraxina 3

PVA - álcool polivinil

Rpm - rotações por minuto

RT-qPCR - reação de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real

SEPT7 - Septina 7

SOFaaci - fluido sintético do oviduto

TNFAIP6 - fator de necrose tumoral alfa induzido 6

TUNEL - do inglês *deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*

VG - vesícula germinativa

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos, os resultados de maturação oocitária em condições de cultivo são insatisfatórios quando comparados à maturação *in vivo*. A maturação oocitária é uma das etapas determinantes para o sucesso da técnica de PIV e resultados insatisfatórios nesta fase alteram drasticamente o desenvolvimento, sobrevivência e implantação embrionárias (Eppig, 2001; Rizos *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2011). Conhecer melhor os mecanismos que controlam a maturação e os fatores que são liberados em resposta às gonadotrofinas durante esta etapa é fundamental para aprimorar a capacitação oocitária e consequentemente melhorar os resultados da PIV de embriões.

O potencial de desenvolvimento oocitário interfere diretamente na taxa final de produção de embriões. Menos da metade dos oócitos produzidos *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (Hansel, 2003), o que pode ser causado, parcialmente, pela utilização de oócitos de baixa qualidade (Rizos *et al.*, 2002; 2003; Lonergan *et al.*, 2003). O motivo pelo qual alguns oócitos apresentam qualidade inferior ainda é pouco conhecido, uma das possibilidades é de que esses oócitos estão mais sujeitos a sofrer apoptose (Ameisen, 2002). Portanto, avaliar e melhorar a qualidade oocitária durante a maturação torna-se fator determinante para o sucesso da técnica.

A suplementação do meio de maturação *in vitro* com fatores de crescimento presentes no ambiente folicular vem sendo utilizada no intuito de tornar o ambiente mais parecido com o que ocorre fisiologicamente. A adição de fator de crescimento epidermal (EGF) durante a MIV, por exemplo, melhora a maturação oocitária, expansão das células do cumulus, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário (Lonergan *et al.*, 1996). A complementação do meio com fator de

crescimento vascular endotelial altera positivamente a fertilização e desenvolvimento embrionários (Luo *et al.*, 2002a, 2002b), enquanto BMP15 e GDF9, individualmente ou em conjunto, melhoram a taxa de produção de embriões (Hussein *et al.*, 2006). Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) vêm sendo apontados como mediadores da foliculogênese e da oogênese em bovinos (Buratini *et al.*, 2005a, 2005b). O fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10), em especial, recebe atenção como regulador putativo do folículo e do desenvolvimento oocitário (Buratini *et al.*, 2005a, 2005b).

O FGF10, originalmente isolado do mesênquima pulmonar de ratos, pertence à subfamília do FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), cujos membros interagem principalmente com os receptores: FGFR2b e FGFR1b (Igarashi *et al.*, 1998; Itoh e Ornitz, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Em células pulmonares foi demonstrado que o FGF10 previne a fragmentação da fita de DNA induzida por estiramento e também os danos oxidativos causados por H₂O₂, além de bloquear a apoptose e diminuir a fragmentação do DNA induzidas por asbesto (Upadhyay *et al.*, 2003; 2004; 2005).

Em bovinos, a expressão do FGF10 foi detectada em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* e células da teca de folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2007; Caixeta, 2012) além disso, a presença dos seus receptores foi descrita nas células da granulosa murais (Berisha *et al.*, 2004) e do cumulus (Cho *et al.*, 2008).

De acordo com Caixeta (2012), a adição de FGF 10 ao meio de MIV melhorou visualmente a expansão das células do cumulus, bem como aumentou a expressão dos principais genes relacionados a esse processo. Ainda durante a maturação, a suplementação de FGF10 aumentou o número de oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar e melhorou a taxa de desenvolvimento embrionário (Zhang *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram a expressão diferencial de mRNA em embriões que apresentam maior probabilidade de desenvolvimento e implantação quando comparados aqueles que falham ao implantar ou não conseguem manter a prenhez (El-Sayed *et al.*, 2006; Ghanen *et al.*, 2011). Dentre esses genes, pode-se destacar *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*. A *COX2* participa da eclosão e do alongamento do embrião (Snabes e Harper, 1984; El-Sayed *et al.*, 2006), enquanto *CDX2* é responsável pela formação da trofoblastoderma e parece estar envolvida na implantação embrionária (Chawengsaksophak *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2008). O gene *PLAC8* atua no desenvolvimento placentário e é altamente expresso no endométrio de vacas gestantes quando comparado a vacas não gestantes (Galaviz-Hernandez *et al.*, 2003). Os genes citados apresentam maior expressão em embriões de melhor qualidade e são pouco expressos em embriões considerados inaptos a implantação.

A adição de novos fatores aos meios utilizados na PIV com o intuito de aperfeiçoar o processo, bem como a análise e aprimoramento da qualidade oocitária, faz-se necessária para o aperfeiçoamento da técnica. Dessa forma, tendo em vista os efeitos positivos do FGF10 na MIV, o experimento proposto visa analisar se a adição deste fator durante a maturação é capaz de interferir positivamente, de forma dose dependente, no estágio de maturação oocitária, na prevenção da apoptose, na quantidade de blastocistos produzidos *in vitro* e na competência do embrião, por meio da mensuração de mRNA dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O agronegócio brasileiro representa 22,74% do produto interno bruto (PIB) do país (CEPEA, 2011) e a pecuária bovina contribui de forma ativa nesse cenário. O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo com mais de 185 milhões de cabeças (BRASIL, 2010), dentre os quais se destacam as raças de corte, consagrando o Brasil como maior exportador de carne dessa espécie. Devido ao interesse crescente em se obter uma exploração maior do potencial genético de fêmeas, a PIV de embriões vem sendo aplicada para o aumento na produção do número de embriões destinados à transferência comercial. O Brasil é o primeiro no mundo em número de embriões produzidos e estima-se que em 2010 foram produzidos 250.000 *in vitro* e 39.000 *in vivo* (Stroud, 2011). A técnica é capaz de superar problemas como os de infertilidade adquirida de vacas com alto valor econômico (Galli *et al.*, 2003) e proporcionar aumento de ganho genético através da multiplicação de bovinos com grande potencial genômico (Vishwanath, 2003).

2.1 Maturação oocitária *in vivo*

Durante a vida fetal, as oogônias sofrem replicação do DNA no estágio pré-leptóteno da primeira divisão meiótica. Após esse processo, ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos, crescimento oocitário pelo aumento no núcleo e também aumento no número de organelas citoplasmáticas (zigóteno). A fase seguinte, paquíteno, é marcada pelo crossing over e pela recombinação entre as cromátides. Os oócitos passam então pelo estágio diplóteno e interrompem o processo em dictióide (Gordon, 1994).

O ambiente folicular é responsável por manter o oócito em prófase I (vesícula germinativa, VG) durante a foliculogênese e também é determinante para retomada da meiose durante a maturação. O oócito retoma a meiose após a indução do pico de LH, quando ocorre a

quebra da VG e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Aktas *et al.*, 1995; Tsafiriri *et al.*, 1996; Bilodeau-Goeseels, 2011). A retomada da meiose dependente do pico de LH é mediada por membros da família de fatores de crescimento epidermal, EGF-like (ampiregulina AREG; epiregulina EREG e betacelulina BTC) através da ativação do receptor (LHR) nas células da granulosa murais. Tendo em vista a ação dos EGF-like como mediadores da ação do LH, um modelo de ação parácrina e endócrina foi proposto por Hsieh e Conti (2005).

Neste modelo, AREG, EREG e BTC são estimuladas através da cascata de sinalização AMPc/PKA, ativada pela interação do LH-LHR nas células da granulosa murais. Como esses membros da família EGF-like precisam ser clivados pelas desintegrinas e metaloproteinases (ADAMs) para serem liberadas em sua forma ativa, as ADAMs são sugeridas como sendo suas principais reguladoras. Em forma solúvel, os fatores EGF-like ativam os receptores de EGF (EGFR) presentes nas células da granulosa e cumulus, o que desencadeia o estímulo de MAPK, especificamente MAPK3/1 (ERK 1/2), essencial para transmitir sinais intracelulares responsáveis por ativar a retomada da maturação meiótica e expansão das células do cumulus *in vitro* e *in vivo*. O mecanismo de retomada da meiose induzido por ERK 1/2 provavelmente envolve a fosforilação da CX43, estimulando o fechamento das junções gap com perda do efeito inibitório do AMP cíclico (AMPc) e GMP cíclico (GMPc) foliculares (Hsieh e Conti, 2005).

O AMPc é um importante fator envolvido na regulação meiótica. Altos níveis oocitários de AMPc são responsáveis por manter o oócito em VG através da supressão da atividade do fator promotor da maturação (MPF). Em adição, a fosfodiesterase do tipo 3 (PDE3), enzima responsável pela degradação do AMPc é inibida pelo GMPc, fornecido pelas células somáticas do folículo (Aktas *et al.*, 1995; Tsafiriri *et al.*, 1996; Bilodeau-Goeseels, 2011). O MPF

é o principal fator da regulação meiótica. Nos folículos pré-ovulatórios esse fator mantém a baixa atividade do oócito, dessa forma, previne a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina, necessários para a entrada do oócito na primeira divisão meiótica. A remoção do oócito do ambiente folicular reduz os fatores inibitórios presentes nas células da granulosa que mantém o nível de MPF baixo ativando a retomada da meiose (Doree *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004).

O potencial de desenvolvimento oocitário interfere diretamente na taxa final de produção de embriões. Menos da metade dos oócitos produzidos *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (Hansel, 2003), o que pode ser causado, parcialmente, pela utilização de oócitos de baixa qualidade (Lonergan *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002; 2003). O motivo pelo o qual alguns oócitos apresentam qualidade inferior ainda é pouco conhecido, uma possível explicação é que os mesmos estão mais suscetíveis a sofrer apoptose (Ameisen, 2002).

2.2 Maturação *in vitro*

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é a etapa determinante para o sucesso da técnica da PIV. A não aquisição da competência oocitária nesta fase reflete principalmente no final do processo, diminuindo a taxa de produção de blastocistos. Apesar do grande avanço na PIV de embriões, os resultados de MIV relacionados ao desenvolvimento, taxas de sobrevivência e implantação embrionárias são inferiores quando comparados à maturação *in vivo* (Eppig, 2001; Rizos *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2011).

Katz-Jaffe *et al.* (2009) demonstraram que oócitos maturados *in vitro* apresentam menores quantidades de mRNA de genes envolvidos em regulação de volume, osmorecepção e ciclo de progressão celular tais como *AQP3* e *SEPT7* e expressão aumentada de SIA ubiquitin ligase 2, envolvida em apoptose induzida por estresse. Ademais, a MIV pode afetar a expressão

de genes no blastocisto. A adição de albumina bovina sérica (BSA) ao meio de maturação aumentou a expressão de *IGF1R*, *IGF2* e *IGF2R* em blastocistos bovinos (dia 9) e o uso de soro fetal bovino na maturação aumentou o mRNA de *HSPA1A*, uma proteína heat shock 70 (Parks *et al.*, 2011). A melhora nas condições de maturação e desenvolvimento de blastocistos pode ser alcançada através da adição de fatores ao meio de maturação tais como ácido linoleico (El-Sayed *et al.*, 2006), leptina (Cross *et al.*, 2003) e FSH (Ullah *et al.*, 2008).

Alguns suplementos como análogos de AMPc e inibidores de PDE3 são usados com sucesso para regular o nível de AMPc nos oócitos. Provavelmente esses fatores atrasam a maturação espontânea, permitindo que o oócito atinja a maturação citoplasmática (Wassarman *et al.*, 1976; Eppig *et al.*, 1985). A presença de fatores de crescimento que tem papel estimulatório na foliculogênese e/ou oogênese no meio de MIV, como EGF e IGF1, também são capazes de melhorar a maturação citoplasmática e aumentar o potencial de desenvolvimento oocitário (Artini *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996).

2.3 Apoptose

A qualidade dos gametas é um fator crucial para o sucesso do desenvolvimento embrionário. O potencial de desenvolvimento oocitário é adquirido durante a oogênese através de diversos fatores celulares e moleculares. A apoptose, caracterizada pela morte celular programada controlada fisiologicamente, está entre os fatores que influenciam a aquisição da competência oocitária em bovinos (Zaraza *et al.*, 2010). Oócitos com qualidade inferior tendem a sofrer apoptose e apresentar sinais típicos como: retração celular; condensação e fragmentação da cromatina, fragmentação e segmentação do DNA (Kerr *et al.*, 1972). Esse processo é responsável pela degeneração de oócitos maturados *in vitro* com ação de estresse térmico (Roth e

Hansen, 2005) e de embriões produzidos *in vitro* (Matwee *et al.*, 2000) ou por transferência de células somáticas do núcleo (Gjorret *et al.*, 2005).

A adição de componentes ao meio de maturação pode influenciar a porcentagem de células apoptóticas. Quando adicionado ao meio de maturação, o IGF1 diminui o número total de oócitos TUNEL-positivos em condições de estresse térmico (Zhandi *et al.*, 2009) enquanto o ácido retinóico 9-cis inibe a apoptose das células do cumulus durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Ded *et al.*, 2011). A apoptose foi confirmada pelos referidos autores através da técnica de deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL).

Embora pouco se saiba sobre os possíveis sinais que podem desencadear a apoptose em oócitos e embriões e o mecanismo preciso pelo qual a apoptose é executada e controlada, todas as vias apoptóticas parecem culminar com a ativação das proteínas da família das caspases. As caspases são divididas em dois grupos: as caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 8 e 9) e as efetoras (caspases 3, 6 e 7; Murphy e Martin, 2003). As iniciadoras são responsáveis pelo processamento e ativação das executoras que por sua vez atuam na clivagem proteolítica de inúmeras proteínas celulares levando a mudanças nas características morfológicas e fragmentação do DNA (Salvessen e Dixit, 1997).

Dentre os genes reguladores da apoptose, existem duas importantes famílias: o gene supressor tumoral p53 e a família do gene *BCL2*. O gene *p53* está envolvido em vários eventos que incluem a pausa no ciclo celular, a estimulação do reparo celular e a apoptose. Os genes da família *BCL2* e suas proteínas correspondentes podem inibir o processo apoptótico ou propagá-lo. Fatores anti-morte da família *BCL2* revinham a liberação do citocromo c da mitocôndria, estabilizando dessa forma o potencial de membrana mitocondrial. No entanto, membros pró-apoptóticos da família propagam a permeabilidade de membrana e o desbalanço iônico, levando

à liberação do citocromo c. No citosol, o citocromo c ativa a caspase-9, que por sua vez estimula a caspase-3, a qual possui um papel central na execução da apoptose, ativando o CAD (da sigla em inglês “caspase-activated DNAase”) responsável pela fragmentação do DNA (Afford e Randhawa, 2002).

2.4 Competência e Desenvolvimento Embrionário Pré-Implantação

Alguns genes foram identificados como importantes para o desenvolvimento embrionário e competência para implantação. Dois experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (El-Sayed *et al.*, 2006; Ghanen *et al.*, 2011) compararam a expressão gênica de biopsias de embriões que sobreviveram após transferência e se tornaram bezerras a embriões que não implantaram ou falharam em manter a prenhez, entre eles foram identificados *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*.

A *COX2* é a isoforma induzida da enzima prostaglandina endoperóxido G/H sintetase, responsável pela síntese de prostanóides. A alta expressão de *COX2* durante a janela de implantação sugere que a prostaglandina liberada pelo embrião exerce importante papel em mediar interações com o útero (El-Sayed *et al.*, 2006), aumentar a permeabilidade vascular endometrial (Kennedy, 1994) e participar do acúmulo de fluido na blastocèle, responsável pela eclosão embrionária (Snabes e Harper, 1984). El-Sayed *et al.* (2006) propuseram que, devido ao fato da proteína COX2 estar localizada nas células trofoblásticas, o gene precursor dessa enzima é necessário para o alongamento do embrião, processo este resultante de uma intensa proliferação de células trofoblásticas e posterior implantação.

O desenvolvimento do blastocisto é dependente de uma correta diferenciação da trofotoderma, que vai regular o transporte de íons e água. O *CDX2* é um fator de transcrição expresso pelo trofotoderma necessário para sua formação e, portanto, determinante para o desenvolvimento normal do embrião (Bell *et al.*, 2008).

Em ratos, já está bem estabelecido que o *Cdx2* é importante para a implantação e desenvolvimento da placenta (Chawengsaksophak *et al.*, 2004). Embriões com ausência do *Cdx2* falharam em implantar, sugerindo defeito no desenvolvimento do trofotoderma, que perdeu sua integridade epitelial e/ou aumentou a apoptose (Chawengsaksophak *et al.*, 2004).

Poucos trabalhos analisaram a expressão de mRNA de *CDX2* em embriões bovinos. Em um destes trabalhos, demonstrou-se que o mRNA do gene *CDX2* encontrava-se supra-regulado em embriões bovinos produzidos *in vitro* que, inovulados, originaram gestação, quando comparado àqueles inovulados que sofreram reabsorção uterina (El-Sayed *et al.*, 2006). Embriões bovinos produzidos por transferência nuclear apresentam expressão de *CDX2* alterada e em quantidade inferior quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. Talvez isto explique o fato de que os embriões produzidos por transferência nuclear apresentem maior taxa de perda embrionária quando comparado com os produzidos *in vivo* (Hall *et al.*, 2005).

O gene *PLAC8* é substancialmente expresso na trofotoderma dos embriões no estágio pré-implantacional e continua sendo expresso nas células trofoblásticas gigantes e na camada de espongiotrofoblastos nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário. Estudos em bovinos mostraram que o *PLAC8* é altamente expresso no endométrio de vacas gestantes quando comparado a vacas não gestantes, sugerindo seu potencial papel no desenvolvimento placentário (Galaviz- Hernandez *et al.*, 2003). A expressão do mRNA de *PLAC8* foi 26 vezes maior nos blastocistos bovinos que resultaram em gestação quando comparada aos que sofreram absorção (El- Sayed *et al.*, 2006), além disso, Ghanem *et al.*, (2011) demonstraram baixa expressão deste gene em vacas não prenhes ou que tiveram perda embrionária, quando comparadas as que pariram, após transferência de embriões.

2.5 Fator de Crescimento Fibroblástico 10

A família dos FGFs é composta de 22 peptídeos, sendo dividida em sete subfamílias (Sleeman *et al.*, 2001). A literatura indica que dois destes fatores de crescimento são expressos pelo oócito bovino, os FGF10 e 17 (Buratini *et al.*, 2007, Machado *et al.*, 2009) e possivelmente estão envolvidos na regulação da diferenciação das células do cumulus, já que elas expressam receptores para esses FGFs.

O FGF10 foi originalmente isolado do mesênquima pulmonar de ratos. Esse fator também conhecido como fator de crescimento dos queratinócitos II (KGFII) pertence à subfamília do FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), cujos membros interagem principalmente com os receptores: FGFR2b e FGFR1b (Igarashi *et al.*, 1998; Itoh e Ornitz, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Ao FGF10 foi atribuída a função de potente agente quimiotático nas porções distais do pulmão, o que permite a ação direcionadora do crescimento celular e tecidual (Min *et al.*, 1998; Sekine *et al.*, 1999).

Upadhyay *et al.*, (2003) demonstraram que o pré-tratamento de células epiteliais alveolares com 10 ng/mL de FGF10 previne a fragmentação e a quebra da fita de DNA induzida por estiramento através da ativação da via MAPK. O mesmo grupo de pesquisa determinou que o FGF10 previne danos oxidativos causados por H₂O₂ (Uphadhyay *et al.*, 2004), bloqueia a apoptose e diminui em 40% a fragmentação do DNA induzidas por asbesto, também por mecanismos que envolvem a via MAPK/ERK (Uphadhyay *et al.*, 2005).

A expressão do FGF10 foi detectada em oócitos e células da teca de folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2007). Apesar da similaridade estrutural entre o FGF7 e o FGF10, seus padrões de expressão diferem no folículo, visto que FGF7 não é expresso em oócitos. Experimentos recentes mostram que o FGF10 é altamente expresso em oócitos bovinos,

maturados *in vitro* e *in vivo* (Caixeta, 2012). Além disso, receptores de FGF10 foram detectados nas células da granulosa murais (Berisha *et al.*, 2004) e do cumulus (Cho *et al.*, 2008), o que reforça a ação parácrina do FGF10, proveniente do oócito e células da teca com alvo nas células da granulosa murais e cumulus.

A suplementação com FGF10 em meio de maturação foi estudada por Zhang *et al.* (2010) que observaram resultados positivos ao elevar as taxas de desenvolvimento embrionário, melhorar a expansão das células do cumulus e aumentar o número de oócitos maduros e com extrusão do primeiro corpúsculo polar. Os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda não foram descritos, mas provavelmente o FGF10 produzido pelo oócito atue nas células do cumulus controlando a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial (Zhang *et al.*, 2010).

Caixeta (2012) demonstrou grande melhora visual na expansão das células do cumulus por adição de FGF10 ao meio de maturação, além disso, o FGF10 aumentou a expressão dos principais genes relacionados à expansão do cumulus (*AREG*, *EREG*, *PTX3* e *TNFAIP6*). A betacelulina, um gene que normalmente é inibido pela ação do FSH em oócitos maduros, na presença do FGF10 teve sua expressão diminuída.

3. REFERÊNCIAS

- AFFORD, S., RANDHAWA, S. Apoptosis. **Mol. Pathol.**, v. 53, p.55-63, 2002.
- AKTAS, H., WHEELER, M.B., ROSENKRANS, C.F., FIRST, N.L., LEIBFRIED RUTLEDGE M.L. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]. **J Reprod Fertility and rep.**, v. 105, p. 227–235, 1995.
- AMEISEN, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 367-93, 2002.
- ARTINI, P.G., BATTAGLIA, C., D'AMBROGIO, G., BARRECA, A., DROGHINI, F., VOLPE, A., GENAZZANI, A.R. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. **Hum Reprod.**, v. 9, p.902-906, 1994.
- BELL, C.E., CALDER, M.D., WATSON, A.J. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 14, p.691-701, 2008.
- BERISHA, B., SINOWATZ, F., SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev.**, v. 67, p.162-171, 2004.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Mol Reprod Dev.**, v. 78, p.734–743, 2011.
- BRASIL, **Estatísticas da Pecuária**. Brasília, 2010. In: Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 01/04/2012.
- BURATINI, J.JR., GLAPINSKI, V.F., GIOMETTI, I.C., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., AVELLAR, M.C., BARROS, C.M., PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and-4, in fetal bovine preantral follicles. **Mol Reprod Dev.**, v. 70, p. 255-261, 2005.
- BURATINI, J.JR., TEIXEIRA, A.B., COSTA, I.B., GLAPINSKI, V.F., PINTO, M.G.L., GIOMETTI, I.C., BARROS, C.M., CAO, M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, p. 343-350, 2005.
- BURATINI, J.JR., PINTO, M.G., CASTILHO, A.C., AMORIM, R.L., GIOMETTI, I.C., PORTELA, V.M., NICOLA, E.S., PRICE, C.A. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biol Reprod.**, v. 77, p. 743–750, 2007.

- CAIXETA, E.S. Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito (FSOs) e seus receptores durante a maturação *in vitro* (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus. **Tese Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências.** Botucatu-SP. 94p . Fev 2012.
- CEPEA, Agronegócio. Piracicaba. USP: 20011 In: **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada.** Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 01/04/2012.
- CHAWENGSAKSOPHAK, K., GRAAFF, W., ROSSANT, J., DESCHAMPS, J., BECK, F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. **Develop. Bio.**, v. 101, p. 7641-7645, 2004.
- CHO, J.H., ITOH, T., SENDAI, Y., HOSHI, H. (2008) Fibroblast growth factor 7 stimulates *in vitro* growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Mol Reprod Dev.**, v. 75, p.1736–1743, 2008.
- CROSS, J.C., BACZYK, D., DOBRIC, N., HEMBERGER, M., HUGHES, M., SIMMONS, D.G., YAMAMOTO, H., KINGDOM, J.C. Genes, development and evolution of the placenta. **Placenta**, v. 24, p. 123-130, 2003.
- DEB, G.K., DEY, S.R., BANG, J.I., LEE, J.G., KONG, I.K. 9-cis retinoic acid inhibits cumulus cell apoptosis during the maturation of bovine cumulus-oocyte-complexes. **J Anim Sci.** p. 2011. Publicado online 8/abril.
- DOREE, M., HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **J Cell Sci.**, v. 115, p. 2461-2464, 2002.
- EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN, D., THOLEN, E., SIRARD, M.A., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, v. 28, p. 84-96, 2006.
- EPPIG, J.J., WARD-BAILEY, P.F., COLEMAN, D.L. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. **Biol Reprod.**, v. 33, p. 1041-1049, 1985.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.
- GALAVIZ-HERNANDEZ, C., STAGG, C., DE RIDDER, G., TANAKA, T.S., KO, M.S.H., SCHLESSINGER, D., NAGARAJA, R. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p. 81-89, 2003.

- GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599–616, 2003.
- GHANEM, N., SALILEW-WONDIM, D., GAD, A., TESFAYE, D., PHATSARA, C., THOLEN, E., LOOFT, C., SCHELLANDER, K., HOELKER, E.M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. **Society of Reproduction and Fertility**, 1470- 1626 (paper) 1741-7899(online), 2011.
- GILCHRIST, R.B., RITTER, L.J., ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci.**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.
- GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reprod Fertil Dev.**, v. 23 p.23–31, 2011.
- GJORRET, J.O. Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by Somatic Cell Nuclear Transfer from Quiescent Granulosa Cells. **Reprod Dom Anim.**, v. 40, p. 210-216, 2005.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Edited by University Press. 639p, 1994.
- HALL, V.J., RUDDOCK, N.T., FRENCH, A.J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. **Mol Reprod and Develop.**, v. 72, p.16-24, 2005.
- HANSEL, W. The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. **Anim Reprod Sci.**, v. 79, p. 191-201, 2003.
- HSIEH, M., CONTI, M. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 16, p. 320-326, 2005.
- HUSSEIN, T.S., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol.**, v. 296, p. 514–521, 2006.
- IGARASHI, M., FINCH, P.W., ARONSON, S.A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **J Biol Chem.**, v. 273, p. 13230-13235, 1998.
- ITOH, N., ORNITZ, D.M. Evolution of the FGF and FGFR gene families. **Trends Genet.**, v. 20, p. 563-569, 2004.
- JONES, K.T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Mol Hum Reprod.**, v. 10, p. 1-5, 2004.

- KATZ-JAFFE, M.G., MCCALLIE, B.R., PREIS, K.A., FILIPOVITS, J., GARDNER, D.K. Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, p. 939-946, 2009.
- KENNEDY, T.G. Involvement of local mediators in blastocyst implantation. In: Glasser SR (ed.), **Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions**. New York: Plenum Press; p.183-194, 1994.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, p. 239-57, 1972.
- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol Reprod.**, v. 54, p. 1420-1429, 1996.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod Domest Anim.**, v. 38, p. 259-267, 2003.
- LUO, H., KIMURA, K., AOKI, M., HIRAKO, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. **J Vet Med Sci.**, v. 64, p. 967-971, 2002.
- LUO, H., KIMURA, K., AOKI, M., HIRAKO, M. Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes. **J Vet Med Sci.**, v. 64, p. 803-806, 2002.
- MACHADO, M.F., PORTELA, V.M., PRICE, C.A., COSTA, I.B., RIPAMONTE, P., AMORIM, R.L., BURATINI J. JR. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J. Endocrinol.**, v. 202, p. 347-353, 2009.
- MAREI, W.F., WATHES, D.C., FOULADI-NASHTA, A.A. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. **Biol Reprod.**, v. 81, p. 1064-1072, 2009.
- MATWEE, C., BETTS, D.H., KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.
- MCNATTY, K.P., MOORE, L.G., HUDSON, N.L., QUIRKE, L.D., LAWRENCE, S.B., READER, K., HANRAHAN, J.P., SMITH, P., GROOME, N.P., LAITINEN, M., RITVOS, O., JUENGEL, J.L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, p. 379-386, 2004.

- MIN, H., DANILENKO, D.M., SCULLY, S.A., BOLON, B., RING, B.D., TARPLEY, J.E., DEROSE, M., SIMONETT, W.S. FGF-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarities to Drosophila branches. **Genes**, v. 12, p. 3156-3161, 1998.
- MURPHY, B.M., MARTIN, S.J. Essential of apoptosis: A guide for basic and clinical research. **Human Press Inc.**, Cap.1, p. 3-12. 2003.
- NEBREDA, A., HUNT, T. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of xenopus oocytes and eggs. **EMBO Journal**, v. 12, p. 1979-1986, 1993.
- PARKS, J.C., MCCALLIE, B.R., JANESCH, A.M., SCHOOLCRAFT, W.B., KATZ-JAFFE, M.G. Blastocyst gene expression correlates with implantation potential. **Fertil Steril.**, v. 95, p. 1367-1372, 2011.
- RIZOS, D., LONERGAN, P., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev.**, v. 61, p. 234-248, 2002.
- RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., PEREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol Reprod.**, v. 68, p. 236-243, 2003.
- ROTH, Z., HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, p. 235-244, 2005.
- SALVESSEN, G.S., DIXIT, V.M. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. **Cell**, v. 91, p. 443-446, 1997.
- SEKINE, K., OHUCHI, H., FUJIWARA, M., YAMASAKI, M., YOSHIZAWA, T., SATO, T., YAGISHITA, N., MATSUI, D., KOGA, Y., ITOH, N., KATO, S. FGF10 is essential for limb and lung formation. **Nat Gen.**, v. 21, p. 138-141, 1999.
- SHYBUYA, E.K., RUDERMAN, J.V. Mos induces the *in vitro* activation of mitogen- activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 781-790, 1993.
- SLEEMAN, M., FRASER, J., MCDONALD, M., YUAN, S., WHITE, D., GRANDISON, P., KUMBLE, K., WATSON, J.D., MURISON, J.G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR-5. **Gene**, v. 271, p. 171-182, 2001.

- SNABES, M.C., HARPER, M.J.K. Site of action of indomethacin on implantation in the rabbit. **J Reprod Fertil.**, v. 71, p. 89-98, 1984.
- STROUD, B. IETS 2011 statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer on domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 29, p.14-23, 2011.
- TSAFRIRI, A., CHUN, S.Y., ZHANG, R., HSUEH, A.J., CONTI, M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol.**, v. 178, p. 393-402, 1996.
- UPADHYAY, D., CORREA-MEYER, E., SZNAJDER, J.I., KAMP, D.W. FGF-10 prevents mechanical stretch-induced alveolar epithelial cell DNA damage via MAPK activation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 284, p. 350-359, 2003.
- UPADHYAY, D., BUNDESMANN, M., PANDURI, V., CORREA-MEYER, E., KAMP, DW. AM. J. RESPIR. Fibroblast Growth Factor-10 Attenuates H₂O₂-Induced Alveolar Epithelial Cell DNA Damage – Role of MAPK Activation and DNA repair. **Cell. Biol.**, v. 31, p. 107-113, 2004.
- UPADHYAY, D., PANDURI, V., KAMP, D.W. Fibroblast growth factor-10 prevents asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Cell Mol Biol.**, v. 32, p. 232-238, 2005.
- ULLAH, Z., KOHN, M.J., YAGI, R., VASSILEV, L.T., DEPAMPHILIS, M.L. Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity. **Genes**, v. 22, p. 3024-3036, 2008.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.
- WASSARMAN, P.M., JOSEFOWICZ, W.J., LETOURNEAU, G.E. Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. **J Cell Sci.**, v. 22, p. 531-545, 1976.
- ZARAZA, J., OROPEZA, A., VELAZQUEZ, M.A., KORSawe, K., HERRMANN, D., CARNWATH, J.W., NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, v. 74, p. 75-89, 2010.
- ZHANDI, M., TOWHIDI, A., NASR-ESFAHANI, M.H., EFTEKHARI-YAZDI, P., ZARE-SHAHNEH, A. Unexpected detrimental effect of Insulin like growth factor-1 on bovine oocyte developmental competence under heat stress. **J Assist Reprod Genet.**, v. 11-12, p. 605-611, 2009.

ZHANG, X., IBRAHIMI, O.A., OLSEN, S.K., UMEMORI, H., MOHAMMADI, M., ORNITZ D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 15694–15700, 2006.

ZHANG, K., HANSEN, P.J., EALY, A.D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. **Reproduction**, v. 140, p. 815–826, 2010.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO FGF10 NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

EFEITOS DO FGF10 NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
BOVINOS *IN VITRO*

Pinto, R.F.P.¹; Fontes P.K.¹; Castilho¹. A.C.S.; Loureiro B.¹; Ticianelli J.S.¹; Buratini J.²; Barros
C.M.^{1a}

¹ Departamento de Farmacologia e ²Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências,
UNESP, Botucatu-SP.

Autor para correspondência: Ciro Moraes Barros; fax: +55 14 38116253; cmbarros@ibb.unesp.br

RESUMO

O fator de crescimento fibroblástico (FGF10) atua de forma parácrina no complexo cumulus-oócito, aumentando a expressão de genes relacionados à expansão das células do cumulus e à competência oocitária. Objetivou-se com o presente estudo testar se a adição do FGF10 ao meio de maturação melhora a maturação, diminui as taxas de oócitos apoptóticos e influencia na produção de embriões *in vitro* e na expressão de genes relacionados à competência e implantação embrionárias (*COX2*, *CDX2* e *PLAC8*). Em todos os experimentos, oócitos foram obtidos de abatedouro, coletados de vacas adultas e maturados por 22 h em meio TCM 199 suplementado com: 2.5 ng/mL FGF10, 10 ng/mL FGF10, 50 ng/mL FGF10 ou na ausência de FGF10 (grupo controle). No Experimento 1, depois da maturação, os oócitos foram fixados e corados com TUNEL para determinar a porcentagem de oócitos apoptóticos e posteriormente com Hoechst-33342 para avaliação dos diferentes estágios da meiose (metáfase 1, metáfase 2 ou metáfase 2 com extrusão do primeiro corpúsculo polar). No Experimento 2, os oócitos foram fertilizados e cultivados até o estágio de blastocisto inicial. No experimento 3 avaliou-se o efeito da suplementação do FGF10 ao meio de maturação *in vitro* sobre a expressão dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8* em embriões bovinos. No experimento 1, os resultados demonstraram que a dose de 2,5 ng/mL FGF10 aumentou a porcentagem de oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar (36%) quando comparado as doses de 10 ng/mL FGF10 (13%), 50 ng/mL FGF10 (12%) e grupo controle (19%; $p \leq 0.05$). Com relação ao número de oócitos apoptóticos, as maiores doses de FGF10 apresentaram menor quantidade de oócitos TUNEL-positivos (10 ng/mL and 50 ng/mL FGF10, 5% e 6%, respectivamente) quando comparados a menor dose (2.5 ng/mL FGF10; 15%) ou ao grupo controle (33%). No experimento 2, os resultados da produção *in vitro* não diferiram entre os grupos. No experimento 3, houve tendência ($P < 0,10$) no aumento da expressão de mRNA de *COX2* e *PLAC8* (50 ng/mL FGF10) e tendência no aumento de *CDX2* (10 ng/mL FGF10). Concluiu-se que a adição de FGF10 ao meio de maturação de oócitos melhora o desenvolvimento oocitário *in vitro*, diminui a porcentagem de oócitos apoptóticos e tende a aumentar a expressão dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*. Entretanto o uso de FGF10 durante a maturação não aumentou a produção de blastocistos.

Palavras- chave: FGF10, oócito, maturação, apoptose.

INTRODUÇÃO

Apesar do grande avanço na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos, os resultados de maturação oocitária em condições de cultivo são insatisfatórios quando comparados à maturação *in vivo*. A maturação oocitária (MIV) é uma das etapas determinantes para o sucesso da técnica de PIV e resultados insatisfatórios nesta fase alteram drasticamente o desenvolvimento, sobrevivência e implantação embrionárias (Eppig, 2001; Rizos *et al.*, 2002; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist *et al.*, 2011). Conhecer melhor os mecanismos que controlam a maturação e os fatores que são liberados em resposta às gonadotrofinas durante esta etapa é fundamental para aprimorar a capacitação oocitária e consequentemente melhorar os resultados da PIV de embriões.

O potencial de desenvolvimento oocitário interfere diretamente na taxa final de produção de embriões. Menos da metade dos oócitos produzidos *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto (Hansel, 2003), o que pode ser causado, parcialmente, pela utilização de oócitos de baixa qualidade (Rizos *et al.*, 2002; 2003; Lonergan *et al.*, 2003). O motivo pelo qual alguns oócitos apresentam qualidade inferior ainda é pouco conhecido, uma das possibilidades é de que esses oócitos estão mais sujeitos a sofrer apoptose (Ameisen, 2002). Portanto, avaliar e melhorar a qualidade oocitária durante a maturação torna-se fator determinante para o sucesso da técnica.

A suplementação do meio de maturação *in vitro* com fatores de crescimento presentes no ambiente folicular vem sendo utilizada no intuito de tornar o ambiente mais parecido com o que ocorre fisiologicamente. A adição de fator de crescimento epidermal (EGF) durante a MIV, por exemplo, melhora a maturação oocitária, expansão das células do cumulus, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário (Lonergan *et al.*, 1996). A complementação do meio com fator de crescimento vascular endotelial altera positivamente a fertilização e desenvolvimento

embrionários (Luo *et al.*, 2002a, 2002b), enquanto BMP15 e GDF9, individualmente ou em conjunto, melhoram a taxa de produção de embriões (Hussein *et al.*, 2006). Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) vêm sendo apontados como mediadores da foliculogênese e da oogênese em bovinos (Buratini *et al.*, 2005a, 2005b). O fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF10), em especial, recebe atenção como regulador putativo do folículo e do desenvolvimento oocitário (Buratini *et al.*, 2005a, 2005b).

O FGF10, originalmente isolado do mesênquima pulmonar de ratos, pertence à subfamília do FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), cujos membros interagem principalmente com os receptores: FGFR2b e FGFR1b (Igarashi *et al.*, 1998; Itoh e Ornitz, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Em células pulmonares foi demonstrado que o FGF10 previne a fragmentação da fita de DNA induzida por estiramento e também os danos oxidativos causados por H₂O₂, além de bloquear a apoptose e diminuir a fragmentação do DNA induzidas por asbesto (Upadhyay *et al.*, 2003; 2004; 2005).

Em bovinos, a expressão do FGF10 foi detectada em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* e células da teca de folículos antrais bovinos (Buratini *et al.*, 2007; Caixeta, 2012) além disso, a presença dos seus receptores foi descrita nas células da granulosa murais (Berisha *et al.*, 2004) e do cumulus (Cho *et al.*, 2008).

De acordo com Caixeta (2012), a adição de FGF ao meio de MIV melhorou visualmente a expansão das células do cumulus, bem como aumentou a expressão dos principais genes relacionados a esse processo. Ainda durante a maturação, a suplementação de FGF10 aumentou o número de oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar e melhorou a taxa de desenvolvimento embrionário (Zhang *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram a expressão diferencial de mRNA em embriões que apresentam maior probabilidade de desenvolvimento e implantação quando comparados aqueles que falham ao implantar ou não conseguem manter a prenhez (El-Sayed *et al.*, 2006; Ghanen *et al.*, 2011). Dentre esses genes, pode-se destacar *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*. A *COX2* participa da eclosão e do alongamento do embrião (Snabes e Harper, 1984; El-Sayed *et al.*, 2006), enquanto *CDX2* é responsável pela formação da trofotoderma e parece estar envolvida na implantação embrionária (Chawengsaksophak *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2008). O gene *PLAC8* atua no desenvolvimento placentário e é altamente expresso no endométrio de vacas gestantes quando comparado a vacas não gestantes (Galaviz-Hernandez *et al.*, 2003). Os genes citados apresentam maior expressão em embriões de melhor qualidade e são pouco expressos em embriões considerados inaptos a implantação.

A adição de novos fatores aos meios utilizados na PIV com o intuito de aperfeiçoar o processo, bem como a análise e aprimoramento da qualidade oocitária, faz-se necessária para o aperfeiçoamento da técnica. Dessa forma, tendo em vista os efeitos positivos do FGF10 na MIV, o experimento proposto visa analisar se a adição deste fator durante a maturação é capaz de interferir positivamente, de forma dose dependente, no estágio de maturação oocitária, na prevenção da apoptose, na quantidade de blastocistos produzidos *in vitro* e na competência do embrião, por meio da mensuração de mRNA dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em todos os experimentos, oócitos foram obtidos de abatedouro, coletados de vacas zebuínas adultas (aneloradas), maturados por 22h em meio TCM 199 suplementado com diferentes concentrações de FGF10 (2,5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL ou na ausência de FGF10 grupo controle; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Após a maturação, no experimento 1 os oócitos foram analisados com relação ao número de extrusão do corpúsculo polar. Posteriormente, os oócitos foram fixados e corados com TUNEL (do inglês terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme) para determinar a porcentagem de oócitos apoptóticos e em seguida com Hoechst- 33342 para avaliação dos diferentes estágios da meiose (metáfase1, metáfase 2 ou metáfase 2 com extrusão do primeiro corpúsculo polar; o número de extrusões do corpúsculo polar não diferiu nas análises feitas antes e após a coloração). No experimento 2, os oócitos, depois de maturados, foram fertilizados e cultivados até o estágio de blastocisto inicial e no experimento 3 foi avaliado o efeito do FGF10 sobre a expressão de genes relacionados a implantação e desenvolvimento embrionários (*COX2*, *CDX2*, *PLAC8*) em blastocistos (Figura 1).

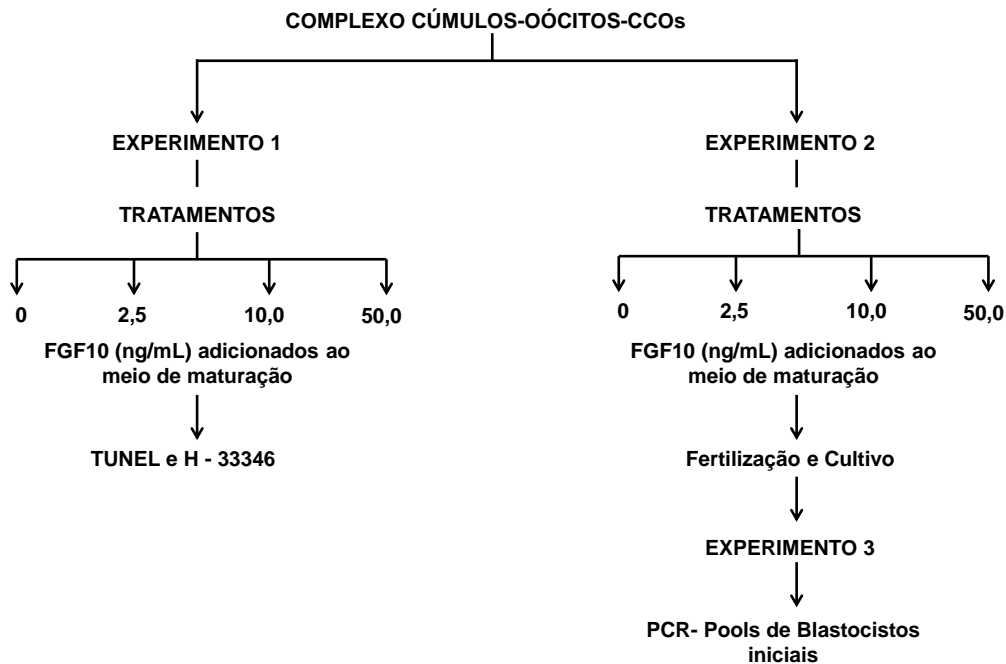


Figura 1. Delineamento experimental.

EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA MATURAÇÃO E NA PORCENTAGEM DE APOPTOSE DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

1.1 Recuperação e classificação dos oócitos

O processo de produção *in vitro* baseou-se na técnica descrita por Eberhard *et al.* (2009). Os ovários bovinos de vacas zebuínas (aneloradas) foram coletados no frigorífico Frigol S.A, localizado no município de Lençóis Paulista (distante 53Km do município de Botucatu) e transportados em recipientes térmicos contendo solução salina (NaCl 0,9%) mantida em temperatura entre 30 e 37 °C.

As aspirações foliculares foram realizadas em dias aleatórios do ciclo estral, utilizando-se uma seringa de 10 mL e agulha 19G. Os folículos de tamanho entre 3-8 mm foram puncionados e os CCOs imaturos depositados em tubos cônicos (Corning®) estéreis imersos em banho-maria a 37 °C.

Após a sedimentação, os oócitos foram classificados de acordo com suas características morfológicas (Schüller *et al.*, 1993). Apenas os CCOs com citoplasma homogêneo, circundados por três ou mais camadas compactas de células do cumulus e os oócitos com menos de três camadas de células do cumulus ou parcialmente desnudos, porém com granulação homogênea no citoplasma, foram selecionados. Os CCOs foram separados aleatoriamente nos grupos experimentais, conforme detalhado acima.

1.2 Maturação oocitária in vitro

Os CCOs selecionados foram lavados três vezes em meio TCM 199 com HEPES contendo 2 µg/mL de piruvato e 75 µg/mL de amicacina. Posteriormente, foram lavados em meio de maturação e distribuídos em cinco gotas de 90µL do mesmo meio até atingirem quantidade de 20 CCOs por gota em uma mesma placa de Petri (TPP®, 60 mm, Zollstr, Suíça). O meio de maturação utilizado foi o TCM 199 com bicarbonato (sem a adição de HEPES) acrescido de 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 2µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 1ng/mL de FSH (Pluset®) e 10 UI/mL de LH (Choriomon®). O FGF10 humano foi adicionado em doses crescentes (0; 2,5; 10 e 50 ng/mL). Para tanto, o FGF10 foi diluído em BSA (4mM HCl/ 0,1%BSA). A maturação dos CCOs foi realizada em incubadora 38,5°C (5% de CO₂ em ar) pelo período de 22 horas.

1.3 Ensaio de TUNEL e coloração Hoechst - 33342

A técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick end labeling, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), foi utilizada para detectar a fragmentação de DNA nos estágios finais da apoptose (morte celular programada), enquanto que a coloração com Hoechst- 33342 foi utilizada para verificação dos estágios de meiose dos oócitos maturados. Para tanto, os CCOs foram maturados em gotas de 90 µL de meio de maturação *in vitro*, conforme descrito anteriormente. Após a maturação, antes de corados, foi observada a extrusão do corpúsculo polar, que não diferiu dos resultados encontrados na análise feita após a coloração de Hoechst- 33342.

A fim de retirar as células do cumulus, os CCOs foram incubados por 10 minutos em hialuronidase (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil; 0,2%; v/v). Adicionalmente, as células do cumulus foram removidas mecanicamente por turbilhamento. Depois de lavados em PBS acrescido de 1mg/mL de polivinil-pirolidona (PVP; PBS/PVP), os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído (3,7%) durante 1h a temperatura ambiente e novamente lavados em PBS/PVP. Após a fixação, os embriões foram permeabilizados, em solução 0,5% de Triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS, por mais 1 h a temperatura ambiente e lavados em PBS/PVP.

Alguns oócitos foram separados para controle positivo e negativo da técnica de TUNEL. Os oócitos do controle positivo foram obtidos pela pré-incubação em solução de DNase (Invitrogen® São Paulo, Brasil; 50 U/mL) a 37°C por 1 h em câmara úmida. Em seguida, os oócitos do controle positivo e dos grupos tratados com diferentes doses do FGF10 foram submetidos à solução de Mix TUNEL (enzima e diluente) durante 1 h a 37°C sob câmara úmida no escuro. O controle negativo foi incubado somente na presença do diluente. Posteriormente,

todos foram lavados em PBS/PVP. Para visualização do material genético, os mesmos oócitos foram depositados na lâmina em solução de Hoechst- 33342 (diluída em glicerol, 10 µg/mL) e posteriormente recobertos por lamínula.

A visualização do material genético fluorescente em azul (corante Hoechst 33342) foi verificada por microscopia de epifluorescência (filtro de excitação de 365 nm e de emissão 420 nm) e indicou o estágio de meiose das células. Oócitos em metáfase 2 e/ou com extrusão do corpúsculo polar foram considerados maduros. Já a visualização de núcleos fluorescentes em verde (ensaio de TUNEL; filtro 450-490nm e de emissão 515nm) indicaram células com fragmentação no DNA.

EXPERIMENTO 2: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A recuperação, seleção e maturação *in vitro* dos CCOs seguiu o mesmo procedimento supracitado.

2.1 Preparo do sêmen e fertilização in vitro

Os oócitos maturados foram transferidos para gotas contendo meio de fertilização, composto de TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL BSA livre de ácidos graxos, 2 µg/mL de piruvato, 75 µg/mL de gentamicina, 11 µg/mL de heparina e 44 µL/mL de solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE).

O descongelamento do sêmen foi realizado em água a 37° C por 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) com densidade descontínua (0,5 mL a 45% sobre 0,5 mL a 90%) em tubo de 1,5 mL e centrifugado a 11.000 rpm por 5 minutos. Os espermatozóides viáveis foram

novamente depositados em tubo de 1,5 mL com 0,4 mL de meio de fertilização e centrifugados por mais 3 minutos a 3.000 rpm para lavagem.

Posteriormente, os espermatozoides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade e concentração (câmara de Neubauer) e diluídos em volume suficiente de meio de fertilização a fim de estabelecer a concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. Em seguida, a fertilização dos oócitos foi realizada utilizando 10 μ L de sêmen diluído, por gota. Os oócitos permaneceram em fertilização por 12-18 h incubados a 38,5°C (5% de CO₂ em ar).

2.2 Desnudamento e cultivo in vitro dos embriões bovinos

Após a fertilização (Dia 0), os prováveis zigotos foram submetidos ao turbilhonamento na própria gota de fertilização por repetidas pipetagens até terem as células do cumulus circundantes removidas. Depois de desnudados, os prováveis zigotos foram transferidos para gotas de 90 μ L meio de cultivo em placas de Petri, onde permaneceram incubados até o estágio de blastocisto (Dia 8).

O meio de cultivo utilizado para o controle foi o SOFaaci (synthetic oviduct fluid; Holm, 1999) acrescido de piruvato de sódio (2%) e BSA (5%). Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram mantidas a 38,5° C em sacos plásticos contendo uma mistura gasosa de 5 % de O₂, 5 % de CO₂ e 90 % de N₂.

As trocas parciais do meio de cultivo foram realizadas 72 horas após a fertilização. Nestas trocas parciais, foram retirados 50 μ L de meio já presente e acrescentados 50 μ L de meio de cultivo fresco em cada gota (“*feeding*”).

No dia 3 de cultivo foi observada a quantidade de embriões que clivaram e quantos deles chegaram ao estágio de oito células. No dia 8 de cultivo embrionário, os embriões foram classificados como blastocisto inicial, blastocisto expandido e blastocisto eclodido.

Os embriões em estado de blastocisto inicial no dia 8 foram agrupados em *pools* de cinco blastocistos para quantificação relativa dos genes-alvo relacionados à qualidade embrionária: *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*.

EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES *PLAC8*, *CDX2* E *COX2* EM EMBRIÕES BOVINOS.

3.1 Extração de RNA total e reação de transcrição reversa

A extração de RNA total dos *pools* de blastocistos (5 blastocistos/*pool*) foi realizada segundo o protocolo RNeasy (Qiagen®). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 25µL água destilada e autoclavada e armazenadas em freezer -80° C até o início das análises de expressão gênica.

Para a reação de transcrição reversa (RT), as amostras de RNA total foram tratadas com DNase para eliminação de eventual contaminação por DNA genômico, antes de serem submetidas ao RT-qPCR (reação de transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real). Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi composto então por 8 µL do RNA total para cada *pool* de blastocistos. A este volume, foi adicionado 1µL de tampão DNase e 1µL de DNase I (1 unidade/µL). Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após esse procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

A reação de RT foi realizada segundo o protocolo Superscript III (Invitrogen®), com a adição (no tubo contendo o RNA total tratado com DNase I), de: 1 µL de oligonucleotídeo

iniciador Oligo dt (500 µg/mL), 1 µL de dNTP Mix (10nM). Esta solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu incubação em gelo por 1,5 minutos. Após estas etapas, foram adicionados à solução, 4 µL de tampão “First Strand” (5X), 1 µL de DTT (0,1M) e 1 µL de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/µL, Invitrogen®). Na sequência, foi acrescido 1 µL de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, 4° C por 2 minutos. Todas as incubações foram realizadas no termociclador PTC200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, CA, EUA). As amostras foram mantidas a -20° C para utilização no qPCR em tempo real.

3.2 Investigação da expressão gênica por PCR em Tempo real

A expressão dos genes-alvo *CDX2*, *COX2* e *PLAC8* foi investigada por ensaio de qPCR em tempo real a partir do mRNA proveniente de *pools* (n=5/grupo experimental) de blastocistos, contendo cada um 5 embriões. Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) utilizando o equipamento StepONE Plus Real Time PCR Systems™ (Applied Biosystem), juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores bovino-específicos correspondentes (Tabela 1). Para a amplificação dos genes constitutivos, foram utilizadas as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores descritas por Machado *et al.*, 2009.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (S: oligonucleotídeo iniciador “sense” A: oligonucleotídeo iniciador “antisense”).

Genes	Sequência	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho (pares de base)
<i>COX-2</i>	S: 5' AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA 3' A: 5' TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT 3'	60	168
<i>CDX-2</i>	S: 5' TGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCACT 3' A: 5' TCCTTCGCTCTGCGGTTCTGAAAT 3'	56	133
<i>PLAC8</i>	S: 5' GAC TGG CAG ACT GGC ATC TT 3' A: 5' CTC ATG GCG ACA CTT GAT CC 3'	60	140

3.3 Análise dos dados de PCR em tempo real

A análise dos dados foi feita pela estimativa da eficiência de amplificação de cada amostra utilizando o software “LinRegPCR” que considera a eficiência com base na curva de amplificação individual de cada tubo. A eficiência de cada gene foi calculada pela média das eficiências individuais de cada tubo analisado.

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência de expressão daquele que foi considerado o melhor controle endógeno (*GAPDH*, Histona H2A ou Ciclofilina A; *CYC-A*). Para selecionar o gene endógeno mais estável, os três genes supracitados tiveram seu padrão de expressão comparados usando o software geNorm para Microsoft Excel (medgen.ungent.be/genorm; Ramakers *et al.*, 2003), o qual apontou a *CYC-A* como o gene constitutivo mais estável.

Os valores de expressão dos genes-alvo foram normalizados pela expressão da *CYC-A* e quantificadas pela equação Pfaffl *et al.* (2001; Figura 2).

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Figura 2. Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por qPCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito gene referência; $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene referência transcrito.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA MATURAÇÃO E NA PORCENTAGEM DE APOPTOSE DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

Após as 22 h de maturação, a maioria dos oócitos, nos grupos tratados com FGF10 e no grupo controle, encontrava-se em estágio de metáfase 2 (MII), sem extrusão do primeiro corpúsculo polar. A porcentagem de oócitos em metáfase 1 (MI) não diferiu entre os grupos experimentais. A concentração 2,5 ng/mL FGF10 apresentou a menor quantidade de oócitos em MII quando comparada ao grupo controle e demais concentrações. Porém, esta mesma concentração, originou maior porcentagem de oócitos com extrusão do corpúsculo polar (Figura 3). Foram realizadas cinco réplicas (54- 99 oócitos por réplica), totalizando 394 oócitos.

A adição de FGF10 ao meio de maturação diminuiu significativamente a ocorrência de apoptose nos oócitos maturados por 22 h e esta diminuição foi mais acentuada nas concentrações de 10 ng/mL e 50 ng/mL (Figura 4).

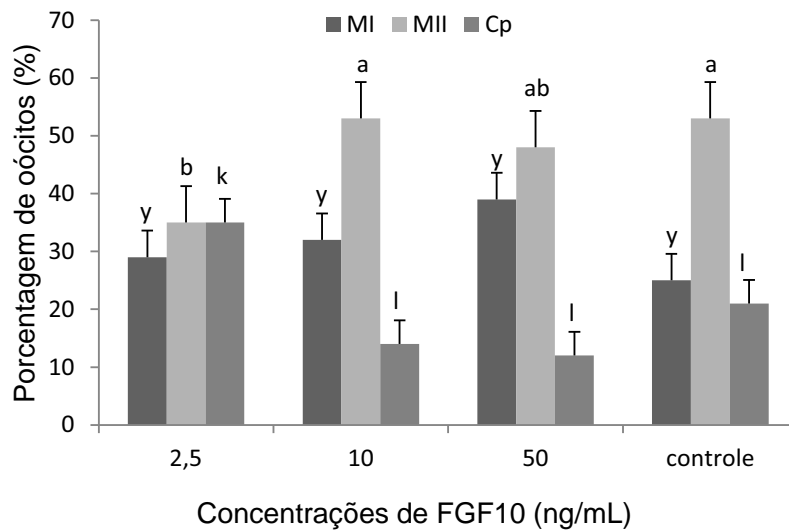


Figura 3. Efeitos de diferentes concentrações de FGF10 (0; 2,5; 10; 50 ng/mL) na porcentagem de oócitos em metáfase I; metáfase II; metáfase II com extrusão do primeiro corpúsculo polar (Cp) corados com Hoechst- 33342 após 22 h de maturação. Os valores são representados como LSMEAN \pm EPM. Foram realizadas cinco réplicas (54-99 oócitos por réplica), totalizando 394 oócitos. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

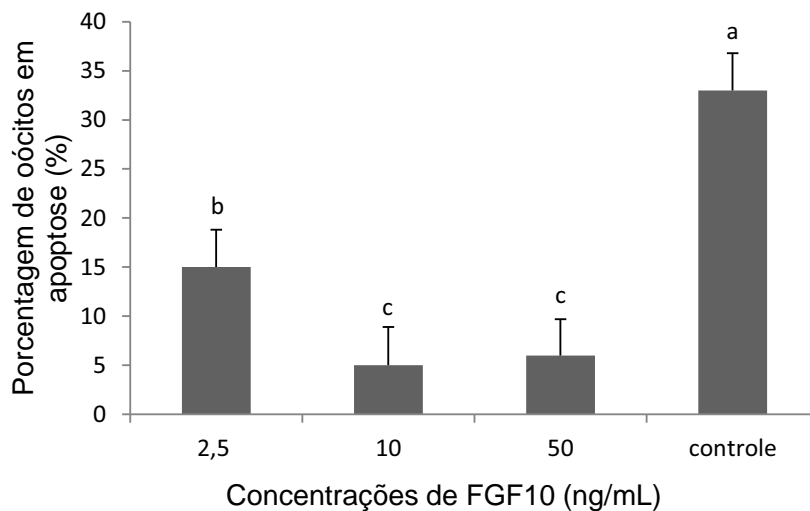


Figura 4. Efeitos de diferentes concentrações (0; 2,5; 10; 50 ng/mL) de FGF10 na porcentagem de oócitos TUNEL positivos após 22 h de maturação. A proporção de oócitos marcados com túnel positivo foi afetada pelo FGF10 em todas as concentrações. Os valores estão representados como LSMEAN \pm EPM. Foram realizadas cinco réplicas (54-99 oócitos por réplica), totalizando 394 oócitos. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 2: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FGF10 NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Foram utilizados 946 oócitos obtidos de fêmeas aneloras (*Bos indicus*) para determinar a taxa de produção de blastocistos. Destes oócitos, 490 foram utilizados para análise de clivagem e mórula. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação às taxas de desenvolvimento embrionário (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de clivagem, mórula e blastocisto (LSMEAN \pm EPM ; n= 5 réplicas). As taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram calculadas em relação número de oócitos. Foram utilizados 946 (161-175 oócitos por experimento) e 490 oócitos (93- 97 oócitos por experimento) para determinação das porcentagens de blastocisto e clivagem/mórula, respectivamente.

FGF10 (ng/mL)	CLIVAGEM (%)	MÓRULA (%)	BLASTOCISTO (%)
2,5	71,94 \pm 4,99	30,05 \pm 7,44	17,75 \pm 3,81
10	71,29 \pm 3,72	23,23 \pm 5,54	10,76 \pm 3,29
50	60,93 \pm 3,72	19,40 \pm 5,54	13,71 \pm 3,29
Controle	70,36 \pm 3,72	20,63 \pm 5,54	13,34 \pm 3,29

EXPERIMENTO 3: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FGF10 NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES *PLAC8*, *CDX2* e *COX2* EM EMBRIÕES BOVINOS

A adição de FGF10 ao meio de maturação tendeu a aumentar ($p < 0,10$) a expressão dos genes *COX2* (50 ng/mL; Figura 5), *CDX2* (10 ng/mL; Figura 6) e *PLAC8* (50 ng/mL; Figura 7).

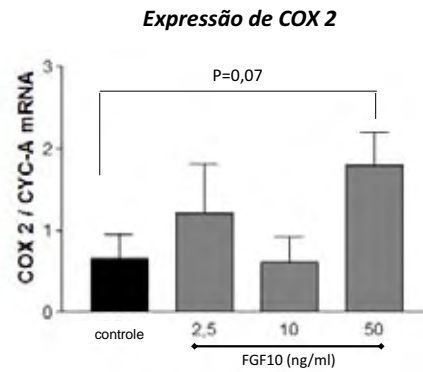


Figura 5. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação *in vitro* sobre a expressão do mRNA do gene *COX2* nos pools de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (n= 5 pool; 5 blastocistos/pool). Os valores médios dos grupos são apresentados como média \pm EPM e foram obtidos pela quantificação do gene alvo em relação ao gene constitutivo *CYC-A* pelo método $\Delta\Delta C_t$ corrigidos pela eficiência da amplificação.

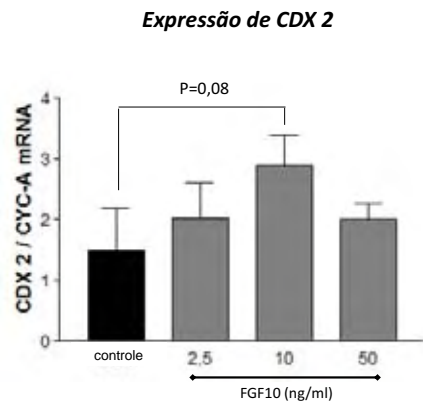


Figura 6. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação *in vitro* sobre a expressão do mRNA do gene *CDX2* nos pools de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (n= 5 pool; 5 blastocistos/pool). Os valores médios dos grupos são apresentados como média \pm EPM e foram obtidos pela quantificação do gene alvo em relação ao gene constitutivo *CYC-A* pelo método $\Delta\Delta C_t$ corrigidos pela eficiência da amplificação.

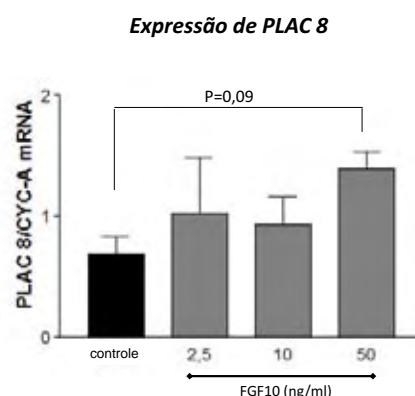


Figura 7. Efeito da adição de FGF10 recombinante durante a maturação *in vitro* sobre a expressão do mRNA do gene *PLAC8* nos pools de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (n= 5 pool; 5 blastocistos/pool). Os valores médios dos grupos são apresentados como média \pm EPM e foram obtidos pela quantificação do gene alvo em relação ao gene constitutivo *CYC-A* pelo método $\Delta\Delta C_t$ corrigidos pela eficiência da amplificação.

DISCUSSÃO

O FGF10, quando adicionado ao meio de maturação, influenciou os estágios de desenvolvimento oocitário, diminuiu a taxa de apoptose e tendeu a aumentar a expressão dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*. Apesar deste efeito benéfico, o FGF10 não aumentou a produção *in vitro* de blastocistos.

Com relação ao desenvolvimento oocitário, observou-se que a adição de 2,5 ng/mL de FGF10 ao meio de maturação promoveu aumento no número de oócitos que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar, corroborando os de resultados de Zhang *et al.* (2010) que observaram o mesmo efeito nas doses 0,5 ng/mL e 50 ng/mL de FGF10.

A avaliação da ativação de diversas proteínas durante a transição do oócito de VG até MII revelou que muitas kinases estão presentes durante a maturação oocitária, mas nem todas encontram-se em seu estado ativo (Nebreda e Hunt, 1993; Shibuya e Ruderman, 1993). Uma das

kinases envolvidas na maturação é a proteína ativadora da mitose (MAPK), que encontra-se em seu estado inativo apenas no estágio de VG. Quando a MAPK é mantida inativa os oócitos não são capazes de romper a vesícula germinativa (Li *et al.*, 2008). Fostatidil Inositol trifosfato (PI3K) também participa da maturação atuando após o estágio MI de maturação (Anas *et al.*, 1998; 2000). Em suínos foi demonstrado que a PI3K atua nas células do cumulus, no fechamento das junções GAP, desencadeando a ativação da p34cdc2 kinase resultando no processo de maturação, após estágio de MI até MII (Shimada *et al.*, 2001). Outro exemplo é a serina/treonina kinase, também conhecida como proteína kinase B (Akt; PKB) que, quando inibida, mantém a maioria dos oócitos em MI (Tomek e Smiljakovic, 2005). Além de participar da maturação, a Akt também está envolvida na inativação de proteínas pró-apoptóticas envolvidas no processo de apoptose, incluindo a caspase 9 (Okumura *et al.*, 2002).

Em bovinos, a não ativação da via MAPK mantém a maioria dos oócitos *in vitro* em estágio de VG (Kubelka *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2003). Por outro lado, quando não há a ativação do PI3K e do Akt os oócitos passam pela quebra da vesícula, mas ficam, em sua maioria, estacionados em MI, o que sugere a participação da via PI3K/Akt não na retomada da meiose, mas sim após o estágio MI de maturação. Além disso, Hoshino e Sato (2008) demonstraram que a inativação da Akt prejudica a extrusão do primeiro corpúsculo polar em camundongos (Hoshino e Sato, 2008; Anas *et al.*, 1998; Tomek e Smiljakovic, 2005). Sendo assim, pode-se especular que o FGF10 estaria possivelmente atuando na ativação da via PI3K/Akt, já que a suplementação do meio com FGF10 não alterou as taxas de oócitos em estágio MI, porém proporcionou maior desenvolvimento após esse estágio, até a extrusão do primeiro corpúsculo polar. A ativação da via PI3K/Akt pelo FGF10 também explicaria sua ação

antiapoptótica, através da regulação de genes da família *BCL2*, como ocorre com o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1*).

Outros efeitos positivos decorrentes da adição do FGF10 durante a maturação foram demonstrados em oócitos bovinos por Zhang *et al.* (2010) e Caixeta (2012). Nos dois estudos, o fator aumentou consideravelmente a expansão das células do cumulus, evento considerado determinante para a melhora da capacidade oocitária e posterior desenvolvimento embrionário (Furnus *et al.*, 1998). Além disso, Caixeta (2012) apresentou resultados positivos relacionados à expressão de genes membros da família de fatores de crescimento epidermal (*EGF*)-like, responsáveis pela expansão das células do cumulus (ampiregulina, *AREG* e epiregulina, *EREG*), adicionando 10 ng/mL de FGF10 ao meio de maturação (22h). Na presença do FGF10, a betacelulina, geralmente inibida pela ação do FSH, teve sua expressão diminuída enquanto genes ativos na presença de FSH (*AREG* e *EREG*) tiveram maior expressão (Caixeta, 2012).

No presente trabalho, além de interferir no estágio de maturação, todas as concentrações de FGF10 testadas reduziram a apoptose de oócitos maturados por 22 h, quando comparados ao controle. Já foi demonstrado que os FGFs 1, 2, 6 e 8 podem inibir a morte celular em diversos tecidos através da prevenção da indução de danos causados por espécies oxidativas (Kwabi-Addo *et al.*, 2004). O efeito antiapoptótico do FGF10, especificamente, foi relatado por Upadhyay *et al.* (2004; 2005), que observaram a influência da adição de FGF10 em culturas de células epiteliais do pulmão, onde os danos celulares causados por asbestos foram minimizados pela adição de FGF10 (1, 10 e 100 ng/mL) através da ativação da via MAPK/ERK. O mesmo grupo descreveu a ação atenuante do FGF10 sobre danos no DNA de células epiteliais do pulmão, causados por estresse oxidativo e pela própria ação mecânica pulmonar, também utilizando a via MAPK/ERK. Em células do cumulus, Salhab *et al.* (2011), demonstraram que

Akts diminuem a frequência de apoptose enquanto as ERKs não estão envolvidas no processo de apoptose. Em embriões, a via MAPK/ERK também não é utilizada para fins antiapoptóticos, mas pode ser utilizada como meio para sinalização da proliferação celular pelo IGF1 (Jousan e Hansen, 2007).

Hansen e Fear (2011) demonstraram que embriões de duas células são resistentes a apoptose por possuírem a mitocôndria resistente a despolarização em resposta a sinais pró e antiapoptóticos. A inibição da despolarização deve-se a combinação de baixa quantidade de proteínas pró-apoptóticas, como BAX, e ao aumento na concentração da proteína anti-apoptótica BCL2 (Hansen e Fear, 2011). Sabe-se que uma das vias responsáveis pela transcrição dos genes *BAX* e *BCL2* é a via PI3K/Akt. Efeitos antiapoptóticos causados pelo tratamento com IGF1, adicionado ao meio de maturação, são dependentes dessa mesma via, PI3K/Akt, que quando inibida, tanto por inibidores de PI3K e/ou Akt, aumenta consideravelmente a quantidade de células túnel positivas embrionárias (Jousan *et al.*, 2008). Como visto anteriormente, uma provável via pela qual o FGF10 atua durante maturação é a PI3K/Akt. A ativação dessa via pelo FGF10, então, poderia não só estar favorecendo a maturação como também a ação antiapoptótica do FGF10, que atuaria na expressão de fatores pró e antiapoptóticos, como ocorre com IGF1.

Apesar de melhorar a maturação oocitária, neste trabalho, o FGF10 não aumentou a porcentagem de oócitos que alcançaram o estágio de blastocisto. Esse resultado, difere daquele relatado por Zhang *et al.* (2010) onde a adição de 0,5 ng/mL ao meio de maturação aumentou as taxas de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A discrepância entre os estudos pode estar relacionada a diversos fatores. O primeiro seria o meio base de maturação utilizado pelo referido grupo, que não foi o mesmo utilizado em nosso experimento. A quantidade de FSH adicionada ao meio foi maior no experimento realizado pelo grupo de Zhang (25 ng/mL) do que em nosso

experimento (1 ng/mL). A diferença na quantidade de FSH no meio pode ter influenciado os efeitos do FGF10, visto que foi demonstrado que o FSH induz a expressão dos receptores de FGF10 nas células da granulosa (Buratini *et al.*, 2007).

Outra diferença relacionada aos meios de maturação utilizados pelos grupos é a presença ou não de BSA. No presente experimento o meio de maturação TCM199 foi suplementado, entre outros fatores, com 4 mg/mL de BSA enquanto que Zhang utilizou o meio TCM199 suplementado com 1 mg/mL de álcool polivinil (PVA). O PVA é um polímero de composição definida ao passo que o BSA é um meio semidefinido composto de vários aminoácidos, fatores de crescimento, vitaminas e outros fatores ainda desconhecidos, essenciais ao desenvolvimento do oócito (Stein e Moore, 1949; Gordon, 2003). Embora tenha sido demonstrado que a cinética da maturação (6 h, 18 h e 24 h) não é afetada pelo meio suplementado com BSA ou PVA (Mingoti *et al.*, 2009) e esses oócitos tenham a capacidade de atingir o estágio de MII e serem fertilizados, Senbon *et al.* (2004) demonstraram que oócitos maturados na ausência de soro apresentam desenvolvimento deficiente e não alcançam estágio de blastocisto (Senbon *et al.*, 2004). Outros trabalhos evidenciaram que a falta de proteínas no meio de maturação retarda a extrusão do primeiro corpúsculo polar, indicando que aminoácidos são necessários para a regulação da fertilização *in vitro* (Eckert e Niemann, 1995; Lim *et al.*, 1999)

A baixa qualidade do meio de maturação do estudo acima citado, sem presença de BSA provavelmente tornou mais evidente a ação do FGF10 nos grupos tratados, já que estes, mesmo com pequenas doses do fator de crescimento (0,5 ng/mL) já estariam minimizando os efeitos negativos na aquisição da competência oocitária, ocasionados não só pela falta de FGF10 como também pela falta de outros fatores fundamentais.

O efeito da suplementação de FGF10 na maturação *in vitro* de embriões foi observado também através da quantificação de mRNA *COX2*, *CDX2* e *PLAC8* em blastocistos. O gene *COX2* é necessário ao processo de alongamento embrionário, resultante da intensa proliferação das células trofoblásticas e subsequente implantação. A alta expressão de *COX2* no período de implantação embrionária sugere um importante papel das prostaglandinas liberadas pelo embrião em mediar interações com o útero (Charpigny *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002). Blastocistos que resultaram em prenhez apresentaram maior expressão do gene *COX2* quando comparados a embriões reabsorvidos depois de serem transferidos (El- Sayed *et al.*, 2006). A expressão de *COX2* em embriões maturados em meio suplementado com FGF ainda não foi descrita, no entanto, Caixeta (2012) observou em células do cumulus de CCOs maturados por 22h em meio acrescido de 10 ng/mL de FGF10, o aumento na expressão de *COX2*, considerado gene alvo da família dos fatores EGF-like e um dos responsáveis pela expansão das células do cumulus (Fru *et al.*, 2007; Portela *et al.*, 2011).

Outro gene analisado, *CDX2*, é um fator de transcrição expresso pela trofoectoderma, necessário a implantação e essencial ao desenvolvimento da placenta, motivo pelo qual anomalias embrionárias podem resultar em problemas placentários ou de implantação (Hall *et al.*, 2005). *PLAC8* é um gene de invasão que, assim como *CDX2*, é expresso na trofoectoderma e está relacionado ao desenvolvimento da placenta. Ambos apresentaram maior expressão em embriões que obtiveram sucesso ao serem implantados, quando comparados aos que sofreram reabsorção (El- Sayed *et al.*, 2006). Embriões *CDX2* nulos falharam ao implantar, devido a perda da integridade das células epiteliais trofoblásticas e/ou ao aumento de apoptose na trofoectoderma (Rossant, 2001; Chawengsaksophak *et al.*, 1997). *PLAC8*, também foi mais expresso no endométrio de vacas prenhas comparado a vacas não prenhas, o que sugere um importante papel

na interface materno fetal (Galaviz- Hernandez *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2006). Ghanem *et al.*, (2011) observaram superexpressão de *PLAC8* em biópsia de embriões que se tornaram bezerros.

Não foram encontrados relatos sobre a expressão desses genes em embriões maturados com adição de FGF10. Porém, Yang (2010), usando duas linhagens de células trofoblásticas de bovinos e ovinos, demonstrou que os FGF2 e 10 induzem a proliferação e migração das células do trofotoderma, o que contribui para o desenvolvimento e alongamento do concepto. Os FGFs 2 e 10, produzidos pelo endométrio uterino ou pelo próprio embrião parecem ser responsáveis pela indução de vários sistemas MAPK que devem ser ativados para promover essa migração e regular o desenvolvimento embrionário, entre eles: ERK1/2, p38MAPK e Stress Activated Protein Kinase/ Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK). No entanto o mecanismo exato pelo qual os FGFs 2 e 10 desencadeiam esses eventos celulares ainda não foram observados.

No presente trabalho houve tendência de aumento em todos os genes testados. A dose de 10ng/mL de FGF10 aumentou a expressão de *CDX2*, enquanto a dose de 50 ng/mL influenciou os genes *COX2* e *PLAC8*. Tais evidências sugerem que, mesmo sem interferir diretamente na taxa de produção *in vitro* de embriões, o FGF10 estaria atuando na qualidade embrionária, visto que a maturação e a aquisição da competência oocitária influenciam diretamente o final do processo de PIV (Sirard e Blondin, 1996; Eppig *et al.*, 2009).

Conclui-se que a adição do FGF10 ao meio de maturação de oócitos melhora o desenvolvimento oocitário *in vitro*, diminui a porcentagem de oócitos apoptóticos e tende a aumentar a expressão dos genes *COX2*, *CDX2* e *PLAC8*. Entretanto, o uso de FGF10 durante a maturação não aumentou a produção de blastocistos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **4**, 367-393
- Anas, M. K., Shimada, M., Terada, T. (1998). Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocyte in vitro. *Theriogenology* **50**, 347-56
- Anas, M. K., Shojo, A., Shimada, M., Terada, T. (2000). Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen- activated protein kinase during bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology* **53**, 1797-1806
- Bell, C. E., Calder, M. D., Watson, A. J. (2008). Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 691-701.
- Berisha, B., Sinowatz, F., Schams, D. (2004) Expression and localization of fibroblast growth factor family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* **67**, 162-171.
- Buratini, J. Jr., Glapinski, V. F., Giometti, I. C., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Avellar, M. C., Barros, C. M., Price, C. A. (2005a). Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and-4, in fetal bovine preantral follicles. *Mol Reprod Dev* **70**, 255-261.
- Buratini, J. Jr., Teixeira, A. B., Costa, I. B., Glapinski, V. F., Pinto, M. G. L., Giometti, I. C., Barros, C. M., Cao, M., Nicola, E. S., Price, C. A. (2005b) Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* **130**, 343-350.
- Buratini, J., Jr., Pinto, M. G., Castilho, A. C., Amorim, R. L., Giometti, I. C., Portela, V. M., Nicola, E. S., Price, C. A. (2007) Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. *Biol Reprod* **77**, 743-750.
- Caixeta, E.S. Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito (FSOs) e seus receptores durante a maturação *in vitro* (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus. 2012. 94 p. Tese Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Botucatu-SP.
- Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J. P., Creminon, C., Guillomots, M. (1997). Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the preimplantation period. *Biol Reprod* **57**, 1032-1040.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F., Beck, F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in CDX2 mutant mice. *Nature* **386**, 84-87.

- Chawengsaksophak, K., Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., Beck, F. (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Develop. Bio* **101**, 7641-7645.
- Cho, J. H., Itoh, T., Sendai, Y., Hoshi, H. (2008) Fibroblast growth factor 7 stimulates in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. *Mol Reprod Dev* **75**, 1736–1743.
- Eberhardt, B. G., Satrapa, R. A., Capinzaiki, C. R., Trinca, L. A., Barros, C. M. (2009). Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim Reprod Sci* **114**, 54-61.
- Eckert, J., Niemann, H. (1995). In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* **43**, 1211-1225.
- El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M. A., Schellander, K., Tesfaye, D. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* **28**, 84-96.
- Eppig, J. J. (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122**, 829-838.
- Fru, K. N., Cherian-Shaw, M., Puttabyatappa, M., VandeVoort, C. A., Chaffin, C. L. (2007). Regulation of granulosa cell proliferation and EGF-like ligands during the periovulatory interval in monkeys. *Hum. Reprod.* **22**, 1247–1252.
- Furnus, C. C., de Matos, D. G., Moses, D. F. (1998). Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: Relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* **51**, 76–83.
- Galaviz-Hernandez, C., Stagg, C., De Ridder, G., Tanaka, T. S., Ko, M. S. H., Schlessinger, D., NAagaraja, R. (2003). Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene* **309**, 81-89.
- Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Gad, A., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Hoelker, M. (2011). Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Society of Reproduction and Fertility*, 1470- 1626 (paper) 1741-7899 (online).
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., Armstrong, D. T. (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 431-446.

- Gilchrist, R. B., Lane, M., Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* **14**, 159–177.
- Gilchrist, R. B. (2011). Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* **23**, 23–31.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. In: Biotechnology in agriculture series, n° 27, 2ª edição. United Kingdom: CAB international, 639p.
- Hall, V. J., Ruddock, N. T., French, A. J. (2005). Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. *Mol. Reprod. and Develop.* **72**, 16-24.
- Hansel, W. (2003). The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **79**, 191-201.
- Hansen, P. J., Fear, J. M. (2011). Cheating death at the dawn of life: Developmental control of apoptotic repression in the preimplantation embryo. *Bioc. Bioph. Research Communications* **413**, 155-158.
- Hoshino, Y., Sato, E. (2008). Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev. Biol.* **314**, 215-23.
- Hussein, T. S., Thompson, J. G., Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* **296**, 514–521.
- Igarashi, M., Finch, P. W., Aronson, S. A. (1998). Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem* **273**, 13230-13235.
- Itoh, N., Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the FGF and FGFR gene families. *Trends Genet* **20**, 563-569.
- Jousan, F. D., Hansen, P. J. (2007). Insulin-Like Growth Factor-I Promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Molecular Reproduction and Development.* **74**. 189-196.
- Jousan, F. D., Oliveira, L. J., Hansen, P. J. (2008). Short-Term culture of in vitro produced bovine preimplantation embryos with insulin-like growth factor-I prevents heat shock induced apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway. *Molecular Reproduction and Development.* **75**, 681-688.
- Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Einspanier, R., Meyer, H. H. D., Schmidt, S. E. M., Reichenbach, H. D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E. (2006). Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. *Biol Reprod* **74**, 253-264.

- Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. (2000). Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod.* **62**, 292-302.
- Kwabi-Addo, B., Ozen, M., Ittmann, M. (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* **11**, 709-24.
- Li, H. K., Kuo, T. Y., Yang, H. S., Chen, L. R., Li, S. S. L., Huang, H. W. (2008). Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation 71 factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **103**, 312-322.
- Lim, J. M., Lee, B. C., Lee, E. S., Chung, H. M., Ko, J. J., Park, S. E., Cha, K. Y., Hwang, W. S. (1999). In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reprod. Fertil. Dev.* **11**, 127-132.
- Lonergan, P., Carolan, C., van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* **54**, 1420-1429.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim* **38**, 259-267.
- Luo, H., Kimura, K., Aoki, M., Hirako, M. (2002a). Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes. *J Vet Med Sci* **64**, 803-806.
- Luo, H., Kimura, K., Aoki, M., Hirako, M. (2002b). Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. *J Vet Med Sci* **64**, 967-971.
- McNatty, K. P., Moore, L. G., Hudson, N. L., Quirke, L. D., Lawrence, S. B., Reader, K., Hanrahan, J. P., Smith, P., Groome, N. P., Laitinen, M., Ritvos, O., Juengel, J. L. (2004). The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* **128**, 379-386.
- Mingoti, G. Z., Caiado Castro, V. S. D., Méo, S. C., Barreto, L. S. S., Garcia, J. M. (2009). The effect of interaction between macromolecules supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote* **18**, 321-328.
- Nebreda, A., Hunt, T. (1993). The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of xenopus oocytes and eggs. *EMBO Journal* **12**, 1979-1986.

- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada, S. S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol.* **4**, 111-116.
- Portela, V. M., Zamberlam, G., Gonçalves, P. B. D., de Oliveira, J. F. C., Price, C. A. (2011). Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* **85**, 1167-1174.
- Rizos, D., Lonergan, P., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* **61**, 234-248.
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* **68**, 236-243.
- Rossant, J. (2001). Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* **19**, 477-482.
- Salhab, M., Tosca, L., Cabau, C., Papillier, P., Perreau, C., Dupont, J., Mermillod, P., Uzbekova, S. (2011). Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology* **75**, 90-104.
- Senbon, S., Fukumi, Y., Hamawaki, A., Yoshikawa, M., Miyano, T. (2004). Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. *J Reprod Dev.* **50**, 541-547.
- Shimada, M., Zeng, W. X., Terada, T. (2001). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase or mitogen-activated protein kinase leads to suppression of p34 (cdc2) kinase activity and meiotic progression beyond the meiosis I stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cells. *Biol Reprod.* **65**, 442-448.
- Schuller, A. G., Van Neck, J. W., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Groffen, C., De Jong, I., Zwarthoff, E. C., Drop, S. L. (1993). Gene expression of the IGF binding proteins during post-implantation embryogenesis of the mouse; comparison with the expression of IGF-I and -II and their receptors in rodent and human. *Adv. Exp. Med. Biol.* **343**, 267-277.
- Shybuya, E. K., Ruderman, J. V. (1993). Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 781-790.
- Snabes, M. C., Harper, M. J. K. (1984). Site of action of indomethacin on implantation in the rabbit. *J Reprod Fertil.* **71**, 89-98.

- Stein, W. H., Moore, S. (1949). Amino acid composition of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin. *J Biol Chem* **178**, 79-91.
- Tomek, W., Smiljakovic, T. (2005). Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction* **130**, 423-30.
- Upadhyay, D., Correa-Meyer, E., Sznajder, J. I., Kamp, D. W. (2003). FGF-10 prevents mechanical stretch-induced alveolar epithelial cell DNA damage via MAPK activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **284**, 350-359.
- Upadhyay, D., Bundesmann, M., Panduri, V., Correa-Meyer, E., Kamp, DW. (2004). Fibroblast Growth Factor-10 Attenuates H₂O₂-Induced Alveolar Epithelial Cell DNA Damage – Role of MAPK Activation and DNA repair. *Am. J. Respir. Cell. Biol.* **31**, 107-113.
- Upadhyay, D., Panduri, V., Kamp, D. W. (2005). Fibroblast growth factor-10 prevents asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **32**, 232-238.
- Wang, H., Wen, Y., Mooney, S., Behr, B., Polan, M. L. (2002). Phospholipase A2 and cyclooxygenase gene expression in human preimplantation embryos. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2629-2634.
- Yang, K. The actions of fibroblast growth factors during periimplantation conceptus development in cattle. 2010. 188p. Tese doutorado. Universidade da Flórida, Gainesville - Fl.
- Zhang, K., Hansen, P. J., Ealy, A. D. (2010). Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction* **140**, 815–826
- Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* **281**, 15694–15700.